

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias

"HIPOTESIS DE MULTIESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS. EFECTO DEL PH, FUERZA IONICA Y COMPOSICION IONICA EN LA PRECIPITACION CUALITATIVA DEL COMPLEJO ANTIGENO-ANTICUERPO"

DESCARTE

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

IMELDA FLORENCIA GAVIRA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fué desarrollado
en el Departamento de Biotec-
nología del Instituto de In-
vestigaciones Biomédicas, de
la U.N.A.M., bajo la dirección
del Dr. Carlos Larralde.

A mis padres.

A mis hermanos.

A Paco con amor

Agradezco la colaboración brindada para la realización de este trabajo al M. en C. Guillermo Baz, a la Srita. Esperanza Ruiz, al Sr. José Avilés.

INDICE

	Pág.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
<u>Antecedentes</u>	10
III. MATERIALES Y METODOS	13
<u>Diseño Experimental</u>	13
1. Preparación de antígenos	15
2. Obtención y purificación de anticuerpos	18
3. Preparación de soluciones amortiguadoras y geles	26
4. Ensayos de D.I.D	32
IV. RESULTADOS	35
V. DISCUSION	47
BIBLIOGRAFIA	54

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ANOVA	Análisis de varianza
BSA	Albúmina sérica bovina
C.I.	Composición iónica
D.I.D.	Doble inmunodifusión
DNBS	Sal sódica del ácido 2,4-dinitrobenzensulfónico
DNP	Dinitrofenol
DNP ₃₂ -BSA	Albúmina sérica bovina con 32 moléculas de DNP por mol de proteína
DNP ₁₅ -ASA	Albúmina sérica humana con 15 moléculas de DNP por mol de proteína
DNP ₁₀ -OA	Ovo albúmina con 10 moléculas de DNP por mol - de proteína
f.i.ó u	Fuerza iónica
-globulina	Gamma globulina
HSA	Albúmina sérica humana
I.E.F.	Inmunoelectroforesis
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
OA	Ovo Albúmina
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos, salina
[A]	Concentración

RESUMEN

Los puentes de hidrógeno, uniones hidrófobas, interacciones iónicas, fuerzas de Von der Waals y fuerzas estéricas repulsivas son --- fuerzas intermoleculares débiles que contribuyen a la estabilización del complejo antígeno-anticuerpo en solución.

Este trabajo es un estudio preliminar para apoyar la hipótesis de que el repertorio de reconocimiento de un anticuerpo puede ser mo dificado por el medio ambiente fisicoquímico de la reacción.

Se hicieron experimentos de doble inmuno difusión utilizando diferentes dosis de anticuerpos de borrego anti-DNP y del antígeno -- DNP₁₅-HSA para investigar si existe correlación entre los cambios en el medio ambiente fisicoquímico -pH, fuerza iónica y composición iónica-, y la precipitación cualitativa del complejo antígeno-anticuerpo.

Los resultados indican:

1. Una alta proporción de reacciones positivas a pH₅ debida probablemente, a cambios conformacionales en los anti cuerpos, provando el desdoblamiento parcial de estos.
2. Una proporción alta de reacciones positivas a altas concentraciones de sales, que se podría explicar en base a la agregación de los anticuerpos en estas condiciones.

Se analizaron estadísticamente los resultados por un ANOVA de 3 vías y se encontró que cada una de las variables exploradas es estadísticamente significativa, ($P < 0.001$), así como las combinatorias de 2 y 3 variables, siendo el cociente de varianzas para efectos de 1 variable: $\text{pH} > \text{composición iónica} > \text{fuerza iónica}$; y para efectos de 2 variables: $\text{pH} - \text{fuerza iónica} > \text{pH} - \text{composición iónica} > \text{fuerza iónica} - \text{composición iónica}$.

Se concluye que las condiciones fisicoquímicas del medio ambiente son determinantes en la precipitación del complejo Antígeno-Anticuerpo en doble difusión, por las múltiples y complejas interacciones que se establecen entre las moléculas de Ac y de Ag, y entre el complejo Ag-Ac y factores fisicoquímicos del medio ambiente.

INTRODUCCION

La función primaria de las inmunoglobulinas es unirse a un an tígeno. La reacción de precipitación del complejo antígeno-anticuerpo -- (Ag-Ac) es una de las más estudiadas y útiles en inmunología. Estas reac-- ción comprende, primero la formación rápida de complejos solubles y des-- pués su agregación hasta formar precipitados visibles. En condiciones -- naturales (in vivo) los complejos Ag-Ac generalmente no precipitan sino - que llevan a cabo diversas funciones efectoras, en que se relacionan con otras moléculas y células del sistema inmune (ver Cuadro I). La precipi-- tación se debe a interacciones iónicas que surgen entre grupos de carga - opuesta de las moléculas de Ac, que tienden a unir a los complejos Ag-Ac volviéndolos hidrófobos y favoreciendo su insolubilidad (1).

Las fuerzas de unión intermolecular entre antígeno y anticuerpo que contribuyen a la estabilización del complejo son las llamadas in-- teracciones débiles, que también son el tipo de fuerzas que estabilizan - la configuración de proteínas y macromoléculas en solución.

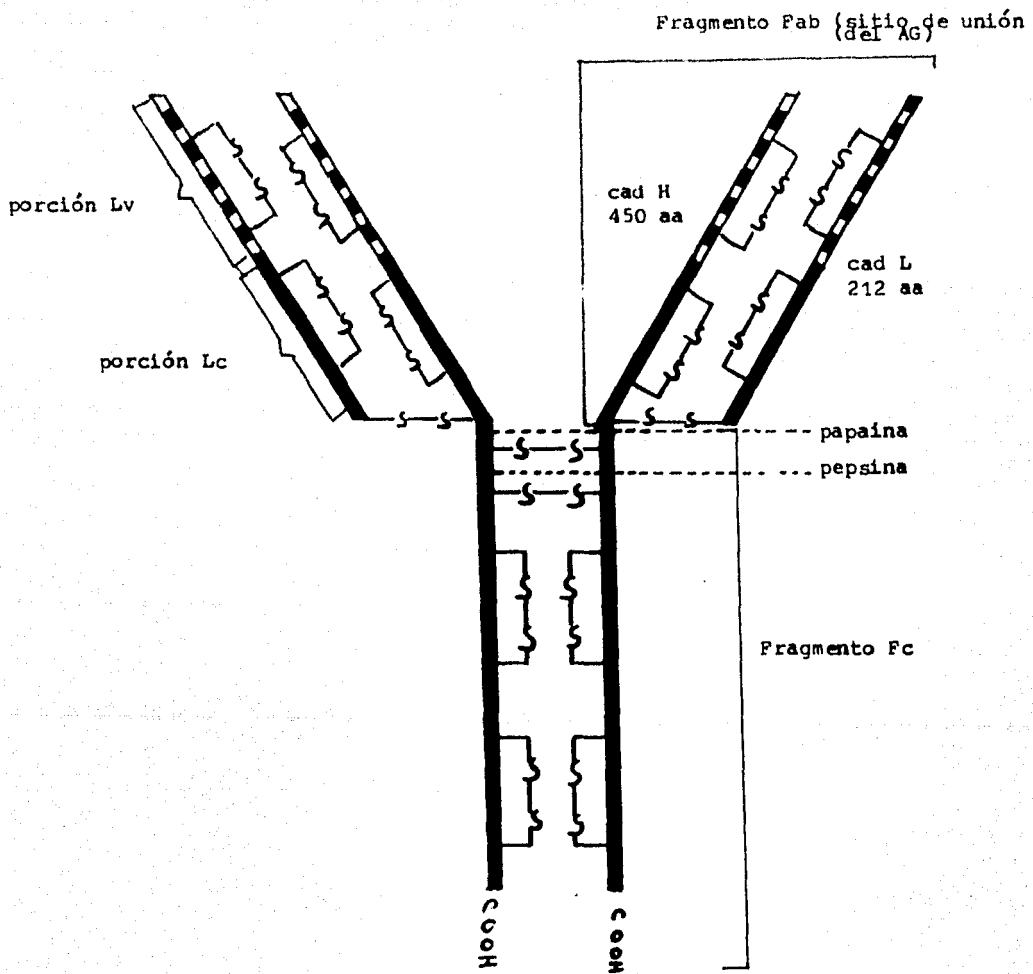
Estas fuerzas son:

- puentes de hidrógeno
- uniones polares o hidrofóbicas
- interacciones iónicas
- fuerzas de Van der Waals
- fuerzas estéricas repulsivas (2)

La estabilidad del complejo Ag-Ac se debe a la interacción - simultánea de algunos aminoácidos del sitio activo (ver Cuadro II) del

Cuadro I. Algunas propiedades de las clases y subclases de inmunoglobulina humanas (1)

Propiedad	IgG-1	IgG-2	IgG-3	IgG-4	IgA-1	IgA-2	IgM	IgD	IgE
Coefficiente de sedimentación (S)	7	7	7	7	7-13	7-13	18-32	7	8
Peso molecular ($\times 10^{-3}$)	150	150	150	150	150-600	150-600	900	?	190
Cadenas pesadas	1	2	2	2	1	2	u		
Carbohidratos (%)	3	3	3	3	7	7	12	13	11
Concentración promedio en suero normal (mg/ml)	8	4	1	0.4	3.5	0.4	1	0.03	0.0001
Vida media en el suero (días, <u>in vivo</u>)	23	23	8	23	6	(6?)	5	3	2.5
Primer Ac detectado en respuestas inmunes <u>larías</u>							+		
Ac más abundante en respuestas inmunes tardías									
Ac en secreciones					+	+			
Pasan a través de placenta	+	+	+	+	0	0	0	?	0
Funciones Efectoras									
% de cadena pesada en linfocitos B (receptores)									
Fija complemento	++	+	++	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	++	?	0 ⁺
Se une a macrófagos	++	+	++	+			0		
Sensibiliza células cebadas	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Sensibiliza células cebadas de cuyo para anafilaxis pasiva	+	0	+	-	0	0	0	?	0



Cuadro II. Representación esquemática de la estructura de 4 cadenas de la IgG humana que muestra los puentes disulfuro intra e intercadenas, los fragmentos que se obtienen mediante digestión con papaína y con pepsina, y la localización de las funciones efectoras.

Fragmento Fab = sitio de unión del Ag;
 Fragmento Fc = fragmento cristalizante;
 Cad H = cadena pesada;
 Cad L = cadena ligera;
 porción Lv = porción variable de la cadena ligera;
 porción Lc = porción constante de la cadena ligera. (3).

Ac, con varios residuos (o átomos) del determinante antigénico. Junto a la variedad de fuerzas no covalentes estabilizadoras, existen interacciones de cada uno de los componentes de la reacción con el solvente, que -- también son determinantes en la especificidad del Ac. La especificidad -- de un Ac se refiere a su capacidad de distinguir, entre determinantes antigénicos de estructuras similares. Como en la naturaleza existen un -- gran número de determinantes antigénicos y cada organismo es capaz de formar Ac con especificidad en contra de todos o casi todos estos determinantes antigénicos ha sido necesario postular que un organismo se genere -- una diversidad de especificidades a nivel de Ac.

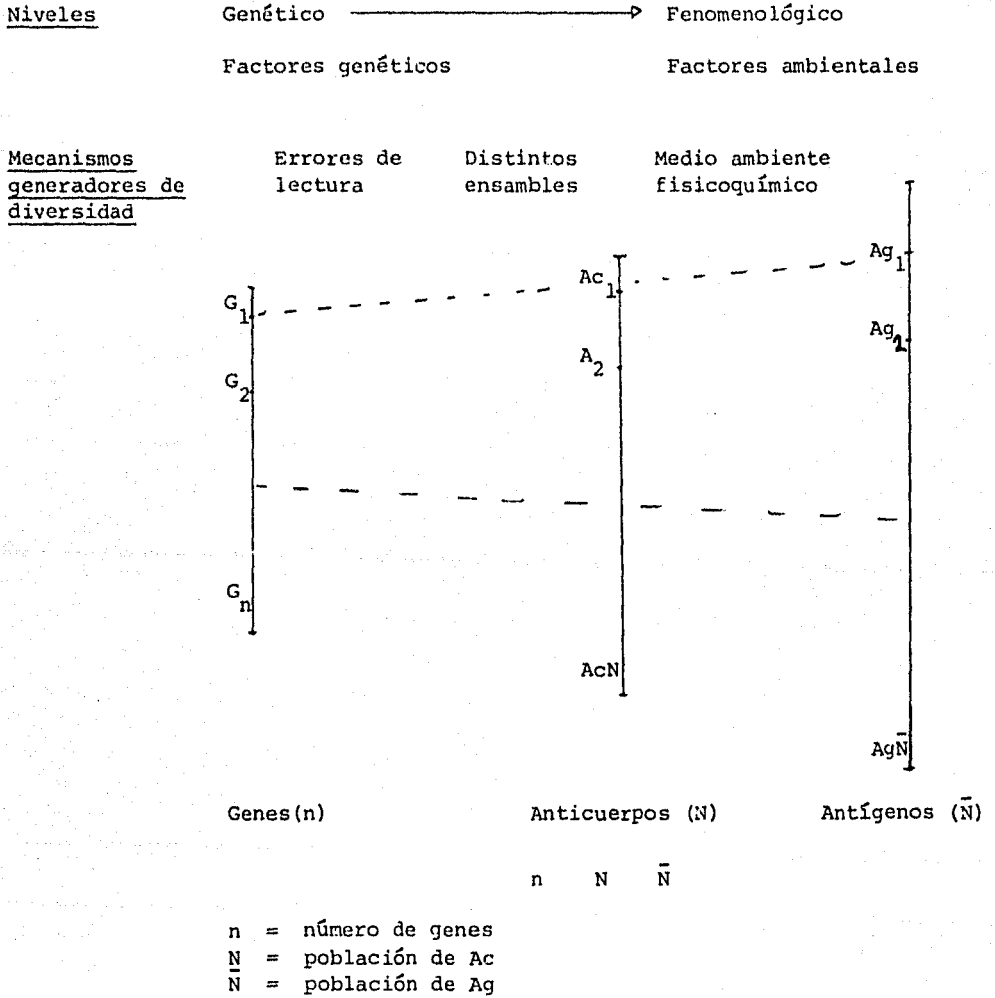
Se han propuesto varios modelos para explicar la generación de diversidad de los Ac, entre los que se cuentan la hipótesis de la línea - germinal (4), la hipótesis de la mutación somática (5,6), y combinaciones de estas dos hipótesis (6). Pero hasta ahora no se ha propuesto una hipótesis que considere la influencia del medio ambiente, sobre la diversidad de los Ac.

Observaciones de anticuerpos que reaccionaban ocasionalmente con un determinante antigénico diferente del que había sido utilizado -- para inducir su producción, (hechas en nuestro laboratorio de Inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas), y observaciones previamente reportadas (7,8,9), nos llevaron a pensar en la hipótesis de que el repertorio de especificidad de un anticuerpo puede ser modificado por el -- medio ambiente fisicoquímico de la reacción. Es decir, que los anticuerpos pueden ser multiespecíficos.

Esta hipótesis considera con igualdad de oportunidades la importancia de factores genéticos y de factores ambientales como fuentes de diversidad de los anticuerpos (Cuadro II).

Además implica que el número de moléculas de Ac que reconocieran a familias de estructuras antigénicas diferentes, que se calcula aproximadamente de 10^{16} (10), es menor que en el caso de que la reactividad de los Ac estuviera dada exclusivamente por la secuencia de aminoácidos.

CUADRO III. FUENTES DE DIVERSIDAD DE LOS ANTICUERPOS



Teorías de evolución \longleftarrow Darwin \longrightarrow \longleftarrow Lamarck \longrightarrow

Integración de los niveles genético y fenomenológico para explicar la generación de diversidad de los anticuerpos.

Explicación del Cuadro I

El nivel genético está representado por los diferentes genes (n) de los linfocitos B que codifican para las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas (Cuadro II). Estos genes pueden dar origen a varias moléculas de Ac(N), de diferentes especificidades, al combinarse sus productos (hipótesis de la línea germinal (4), hipótesis de la mutación somática (5,6), o combinaciones de ambas (6')).

Considerando errores de lectura durante la transcripción o traducción de los genes de cadenas pesadas y ligeras, o distintos tipos de ensamblajes entre cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas, podemos ver que el número de moléculas de Ac diferentes aumenta.

Asimismo proponemos que la interacción de un Ac con un Ag en condiciones diferentes del medio ambiente (pH, f.i., composición iónica, temperatura, etc.), a las fisiológicas, puede ampliar el repertorio de reconocimiento de un Ac.

Consideramos que el nivel genético va de acuerdo con la teoría evolutiva de Darwin, y que el nivel fenomenológico de generación de diversidad de los Ac está de acuerdo con la teoría de Lamarck.

Esta hipótesis presenta un mecanismo alternativo de generación de diversidad de anticuerpos en dos sistemas biológicos que tienen límites lógicos de extensión, que son: a) el contenido de información genética de un linfocito B y b) el número de clonas distintas de linfocitos B que pueden existir simultáneamente en un vertebrado.

Con respecto al primer punto, una célula diploide de mamífero tiene aproximadamente 1×10^{-11} d de DNA, que puede codificar para 4×10^9 residuos de aminoácidos en proteínas. 1×10^4 genes V (Cuadro II), cada uno codificando para 110 residuos, ocuparán aproximadamente el 0.025% del total del genoma. Si el número de genes VL y VH fueran iguales y sus productos se pudieran aparear al azar, y, si cada secuencia del par VL - VH estableciera un sitio activo específico único, este número de genes podría generar cerca de 1×10^8 Acs diferentes (1).

Con respecto al segundo punto, en un ratón hay aproximadamente 2×10^8 linfocitos B que representan no más de 1×10^7 clonas distintas (considerando cada clona integrada por 20 células, en un tiempo determinado, y estas clonas pueden aumentar de 1×10^8 a 1×10^9 como resultado de mutaciones somáticas (10).

Sin embargo persiste la paradoja de que hay probablemente cuando menos 1×10^{16} familias de estructuras antigénicas diferentes y cuando más 1×10^9 sitios activos diferentes de Ac definidos genéticamente. Aún si partieramos de cifras diferentes a las mencionadas, los límites se acercarían no

más que algunas órdenes de magnitud; así pues, parece lógico considerar a los Ac γ como multiespecíficos.

Una etapa preliminar para probar el posible contenido de verdad de la hipótesis propuesta se realizó con los experimentos que aquí se reportan.

Antecedentes

A continuación se resumen algunos trabajos que ilustran la influencia del medio ambiente sobre las propiedades físicas y químicas de algunos Igs.

Phelps y Cann en 1957 (11), hicieron estudios de sedimentación, viscosidad y presión osmótica con gammaglobulina bovina en condiciones ácidas y a diferentes fuerzas iónicas, y concluyeron que en condiciones de $\mu = 0.1$ y pH 5.3 \rightarrow la proteína sufre cambios conformacionales que afectan su constante de sedimentación. Por otra parte observaron que a concentraciones elevadas de sal y de iones hidrógeno se puede causar agregación de la proteína. Concluyen que estos cambios en la conformación pueden deberse a fenómenos de turgencia molecular.

En 1970 Doi y Jorgensons (12) estudiaron la desnaturalización ácida de la inmunoglobulina G humana (Cuadro I), usando métodos físicos (D.O.R. dispersión óptica rotatoria), y encontraron que fuerzas iónicas bajas favorecen la desorganización y separación de las cadenas poli-

peptídicas en solución ácida, lo que fue confirmado con datos de sedimentación y viscosidad. Concluyen que esto es causado por fuerzas electrostáticas repulsivas que neutralizan uniones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno.

También observaron que una alta concentración de sal inhibe la desorganización causada por las condiciones ácidas.

Paulssen et al (1978) (14), estudiaron la influencia de diferentes condiciones experimentales físicas y químicas, (temperatura, concentración de cloruro de sodio, pH) en la constante de asociación de la interacción entre IgA y anticuerpo insoluble anti-IgA, mediante radioinmunoensayo, y encontraron que la constante de asociación se altera por la temperatura, (nivel de significancia 99%), la concentración de cloruro de sodio y la combinación de pH, ácidos y básicos, con la presencia de seroalbúmina bovina en el medio (nivel de significancia 95% para ambos).

En 1979 Knight y Green (15), al hacer experimentos de la interacción de grupos dinitrofenil (DNP), unidos a seroalbúmina humana con fragmentos univalentes (Fab, Cuadro II) de Ac anti-DNP, observaron que la mayoría de los grupos DNP no eran accesibles al Ac a pH 8, pero a pH 3 su accesibilidad aumentaba aproximadamente 3 veces.

Estos experimentos ponen de manifiesto el hecho de que la γ -globulina bovina y la IgG humana sufren cambios conformacionales cuando se exponen a condiciones de pH ácidos, y fueras iónicas bajas; en la IgA humana, la temperatura y la fuerza iónica alteran la constante de aso

ciación con anti-IgA; y el pH altera la conformación de la sero albúmina dinitrofenilada. Es decir, que factores del medio ambiente como pH, fuerza iónica y temperatura influyen de hecho en la conformación tridimensional de proteínas del sistema inmune y que afectan sus características fisicoquímicas y su funcionalidad.

El objetivo del presente trabajo es investigar si existe alguna correlación entre los cambios en el medio ambiente fisicoquímico - pH, fuerza iónica, composición iónica- y la precipitación cualitativa -- del complejo Ag-Ac. Esto se pretende lograr haciendo experimentos de doble inmunodifusión con diferentes dosis de Ac de borrego anti-DNP y -- DNP₁₅-HSA como Ag, en diversas combinatorias de las variables ya mencionadas, y analizando los resultados mediante un ANOVA de 3 vías.

MATERIALES Y METODOS

Diseño Experimental

Se investigó cualitativamente por medio de D.I.D. (doble inmuno difusión), si el pH, concentración de sales y composición iónica -- tienen efecto en la precipitación del complejo Ag-Ac, con la ayuda de un diseño experimental de 5 factores:

Factores:	Número de niveles por factor	Niveles:
pH	7	3,4,5,7,4,9,10,11
f.i. (μ)	3	0.021, 0.21, 2.1
(composición de la solución amortiguadora)	2	(sol. amortiguadora de Sørensen) (sol. amortiguadora de Barbital)
[Ag]	3	0.12, 0.25, 0.5 mg/ml de DNP ₁₅ -HSA
[Ac]	6	1.1, 1.5, 1.9, 2.3, 2.7, 3.1 mg/ml de Ac anti-DNP

La variable de respuesta es la banda de precipitación (cualitativa). El diseño tiene 10 réplicas en c/u de las combinatorias de variables utilizadas.

Se escogió un diseño experimental multifactorial por las ventajas que ofrece:

1. Es más eficiente que experimentos usuales de 1 solo factor,
2. Todos los datos se usan para computar todos los efectos de las variables;

3. Se obtiene información acerca de las posibles interacciones entre los factores y sus combinaciones.

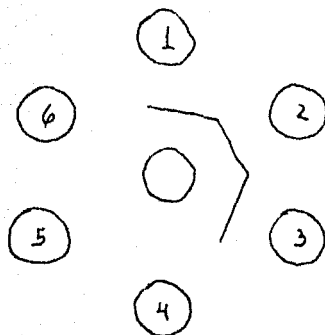
Por la naturaleza de los experimentos, el diseño es multifactorial con 2 variables anidadas, y se analizó por un ANOVA de 3 días (31,32). Se escogieron los pHs mencionados para tener un rango amplio de comparación de la funcionalidad de los Ac, a pHs ácidos (3,45) y pHs básicos (9,10,11).

La f.i. "fisiologica" es $\mu = 0.21$, y se decidió investigar la influencia en la precipitación de complejos Ag-Ac, de f.i. 10 veces mayores ($\mu = 2.1$) y de f.i. 10 veces menores ($\mu = 0.021$) que la normal.

Asimismo los 2 tipos de soluciones amortiguadoras empleadas son de naturaleza distinta en cuanto a su composición de iones y su comportamiento frente al agua. Sørensen posee los iones Na^+ (sodio), K^+ (potasio), HPO_4^- (fosfato dibásico), H_2PO_4^- (fosfato monobásico), Cl^- (cloruro), y es hidrofílico, mientras que Barbital posee los iones, Na^+ (sodio), $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3^-$ (barbital), $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$ (acetato), Cl^- (cloruro), y es hidrofóbico. Además el rango amortiguador del Barbital es más amplio (véase preparación de soluciones amortiguadoras de Barbital).

Se usaron las distintas dosis de Ac y de Ag para aumentar las probabilidades de observar cambios en la precipitación.

Se mencionó anteriormente que la variable de respuesta es la banda de precipitación y se dijo que es cualitativa, porque el resultado de una D.I.D. puede ser sí hay banda, o no la hay:



pozo 1 Ac (concentración 1); positivo
pozo 2 Ac (concentración 1:2); positivo
pozo 3 Ac (concentración 1:4); positivo
pozo 4 Ac (concentración 1:8); negativo
pozo 5 Ac (concentración 1:16); negativo
pozo 6 Ac (concentración 1:32); negativo

Como el diseño tiene 10 réplicas en cada una de las combinato-
rias de variables utilizadas, el máximo valor numérico que puede alcanzar
cada combinatoria es de 1 (en el caso en que las 10 réplicas haya sido --
positivas, es decir, hayan tenido banda de precipitación).

Se utilizó una prueba de F para evaluar si las variaciones -
(varianzas) de los promedios de las combinatorias utilizadas son iguales
o si provienen de poblaciones diferentes (diferencias causadas por el tra-
tamiento experimental).

Doble inmuno difusión. A grosso modo esta técnica consiste en
verter agarosa disuelta en una solución amortiguadora y en forma líquida -
(caliente) sobre una laminilla. Cuando gelifica se perforan 7 pozos dis-
puestos en forma de roseta, en los cuales se colocan el Ac y el Ag, a vo-
luntad. Los reactivos van a difundir en el gel de agarosa con una veloci-
dad en proporción inversa a sus pesos moleculares. En la zona donde el Ag
y el Ac si encuentran en equivalencia se forma una banda de precipitación
(Figura 1).

1. Preparación de antígenos

Se utilizó DNP como haptino por la abundante información que

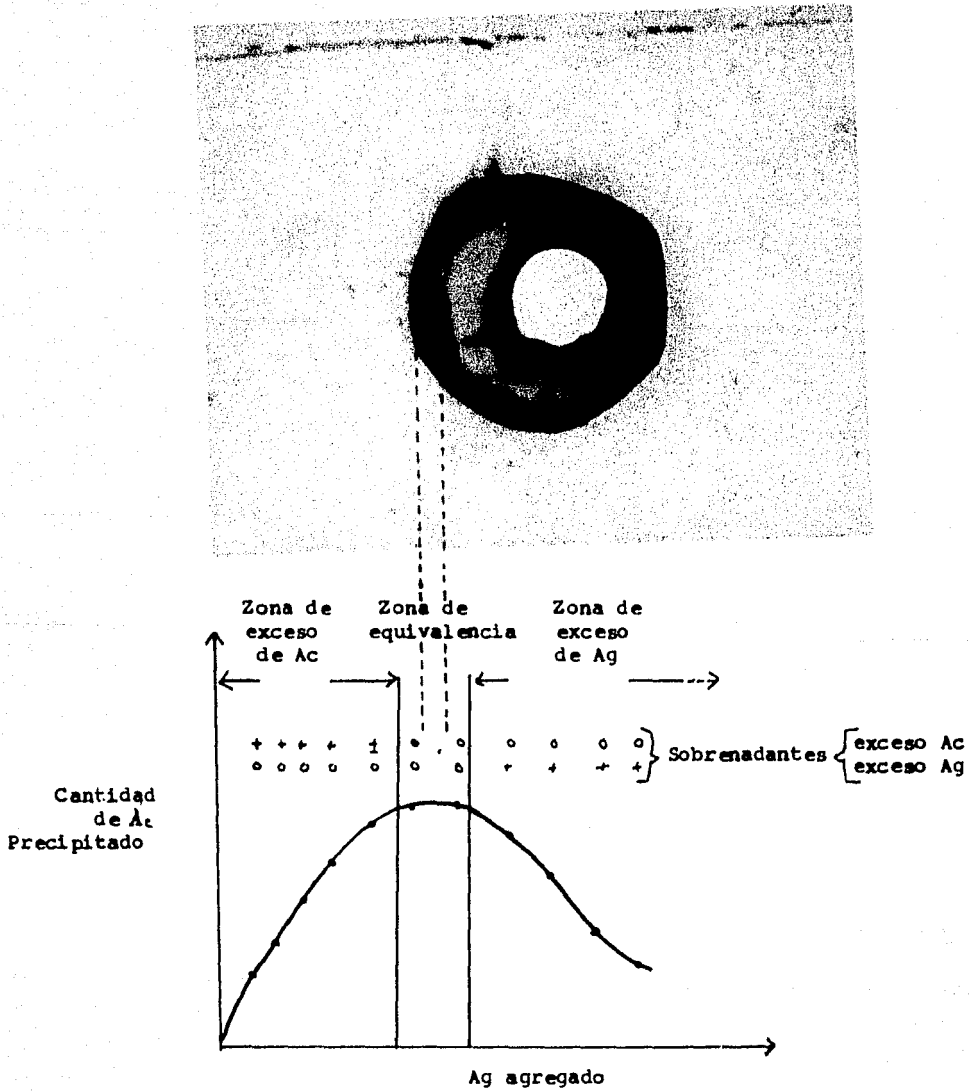
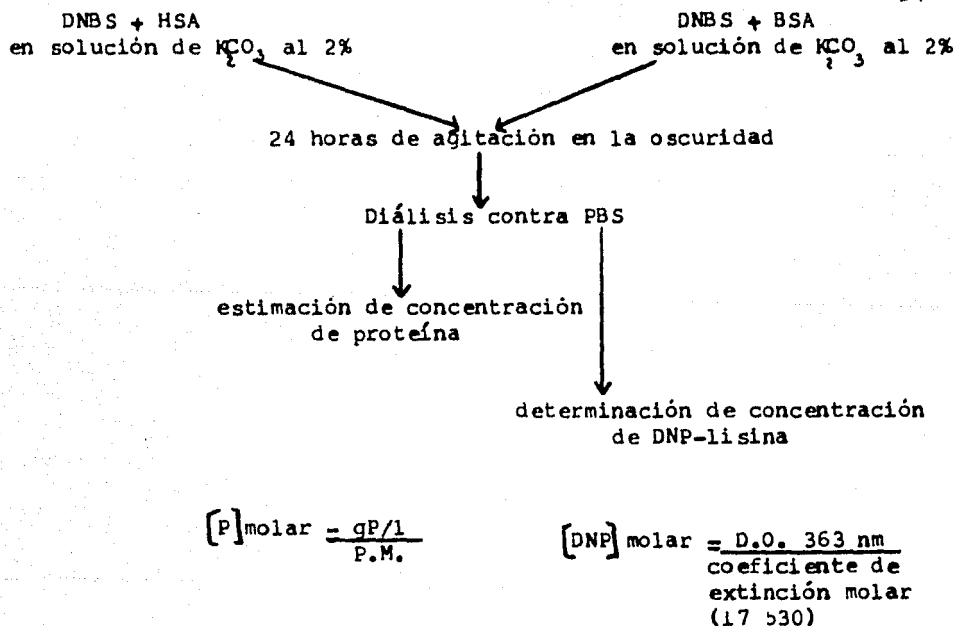


Fig. 1. Curva de precipitación característica de un sistema Ag-Ac monoespecífico. A una cantidad fija de Ac se le agregan cantidades crecientes de Ag. La parte superior relaciona esta curva de precipitación con lo que sucede en D.I.D. (Antisuero anti-DNP en el pozo central y DNP-HSA en los pozos periféricos, en concentraciones decrecientes).

hay acerca de su capacidad inmunogénica (16), y la facilidad de acoplarlo a una proteína acarreadora. Como acarreadores se usaron sero albúmina bovina (BSA) en el caso del Ag inoculado al borrego, y sero albúmina humana (HSA) como Ag en las reacciones in vitro, para asegurarse que no hubiera reacciones cruzadas entre los acarreadores utilizados para inmunización y en las pruebas de D.I.D.



Estimación del número de moles de DNP por mol de proteína (α):

$$\alpha = \frac{[DNP] \text{ molar}}{[P] \text{ molar}}$$

Fig. 2. Esquema para la preparación de los antígenos DNP-HSA y DNP-BSA.

a) Preparación del conjugado DNP₃₂-BSA

Se preparó según el método de Eisen (17): 500 mg de DNBS -- (Eastman) y 200 mg de BSA (Sigma) se agregaron a 40 ml de una solución -- de K₂CO₃ (Baker) al 2%. La mezcla se puso en agitación suave 24 horas a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Posteriormente se dializó -- contra buffer de fosfatos salino (PBS 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.4), para -- eliminar el DNBS libre. Se estimó la concentración de BSA por el método de Nessler (18), y se determinó la concentración de DNP-lisina por la -- densidad óptica del conjugado a 363 nm, considerándose un coeficiente de extensión molar de 17,530 (19) (Ver figura 2).

b) Preparación del conjugado DNP₁₅-HSA

Se preparó como el conjugado DNP₃₂BSA, pero con 500 mg de -- DNBS y 1g de HSA en 100 ml de K₂CO₃ al 2%.

2. Obtención y Purificación de Ac anti-DNP (Fig. 3)

a) Inmunización y sangrado del borrego

Se administró 1 ml de DNP₃₂-BSA con una concentración de -- 5 mg/ml, a un borrego hembra por vía intramuscular, que había sido sensi bilizado anteriormente con el mismo Ag y con adyuvante completo de Freund. Se sangró el borrego (500 ml) por la vena yugular después de 8 días de la inmunización secundaria.

Se separó el suero y se centrifugó durante 15 min. a 3500 r.p.m.

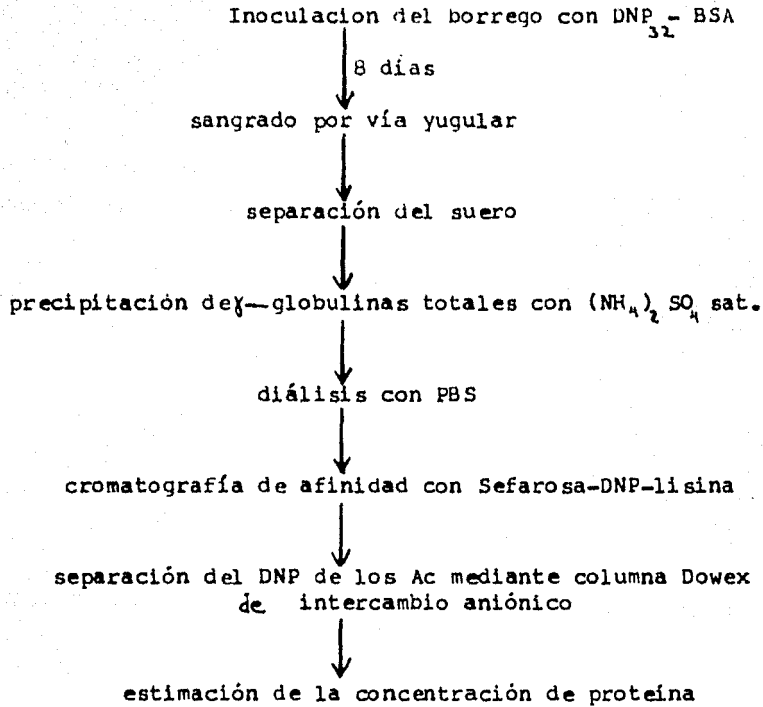


Fig. 3. Esquema para la obtención y purificación de Anticuerpos anti-DNP de borrego.

para eliminar eritrocitos.

Se probó la presencia de Ac anti-DNP en el suero mediante D.I.D. (20), con varias concentraciones de DNP_{15} -HSA, obteniéndose resultados positivos (Fig. 4).

b) Obtención de gamma-globulinas totales

Se precipitaron las γ -globulinas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 33% de saturación, pH 7.4 a temperatura ambiente. Se centrifugó a 9,000 r.p.m. durante 20 min, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en un volumen de PBS igual al volumen inicial de suero (21).

La precipitación y centrifugación se repitieron 4 veces, hasta obtener una solución de γ -globulinas translúcida e incolora, sin contaminación aparente de hemoglobina.

Posteriormente se dializó contra PBS a 4°C para eliminar el sulfato de amonio, y para verificar esto se mezcló una alícuota del buffer de diálisis con otra alícuota de una solución de BaCl_2 al 10%, ácida. En ausencia de iones sulfato no se forma la sal insoluble BaSO_4 y por lo tanto la solución permanece transparente.

Se verificó la presencia de Ac precipitantes anti-DNP haciendo D.I.D.

Posteriormente se realizó una inmunolectroforesis para verificar la pureza de la γ -globulina G, utilizando como antígeno a la prepa

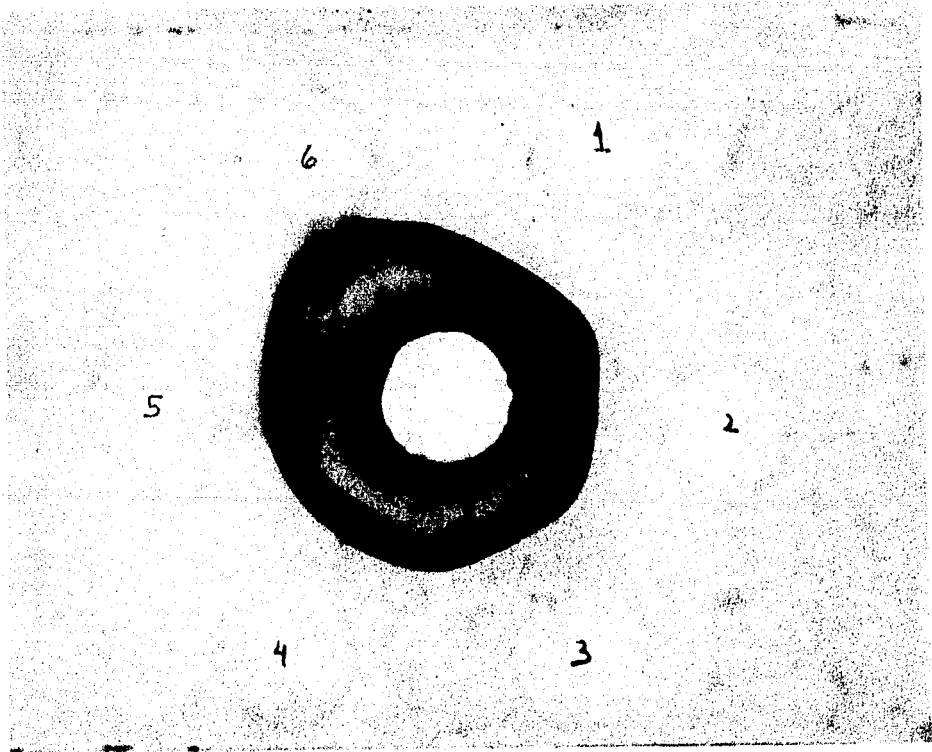


Fig.4. D.I.D. del suero de borrego inmunizado con $\text{DNP}_{32}\text{-BSA}$, contra el antígeno $\text{DNP}_{13}\text{-HSA}$ utilizado en las reacciones in vitro. El suero está en el pozo central, el Ag en los pozos periféricos, en concentraciones decrecientes en el sentido de las manecillas del reloj.

ración de γ -globulinas y un antisuero anti-proteínas totales del suero de borrego producido en cerdo, revelando solo una banda en la región de la IgG (Figura 5).

c) Purificación de anticuerpos

Este proceso se realizó mediante cromatografía de afinidad, utilizando Sefarosa 4B (Pharmacia) acoplada a DNP-lisina (Sigma), según una modificación del método de Mark, Porikh y Cuatrecasas (23).

En un matraz Erlenmeyer de 500 ml se puso una mezcla de volúmenes iguales de γ -globulinas y Sefarosa-DNP-lisina, 100 ml de c/u; se dejó incubar toda la noche a 25°C con agitación suave. Con esta operación se unen las γ -globulinas específicamente dirigidas en contra del DNP (es decir, los anticuerpos anti-DNP), a la Sefarosa-DNP-lisina.

Al día siguiente se vertió la mezcla de reacción en un embudo Büchner y se filtró suavemente con vacío, lavándose con 100 ml de PBS, para lavar las γ -globulinas que no se habían pegado a la Sefarosa-DNP-lisina.

Se transfirió la Sefarosa (ahora un complejo formado por Sefarosa-DNP-lisina-Ac-DNP) a otro matraz y se le agregó 100 ml de DNP 1×10^{-3} M disuelto en PBS, dejándose incubar 90 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posteriormente se vertió la Sefarosa a un Büchner y se filtró muy lentamente, lavando con 20 ml de DNP 1×10^{-3} M para separar los Ac anti-DNP unidos al DNP acoplado a la Sefarosa. El DNP en so-

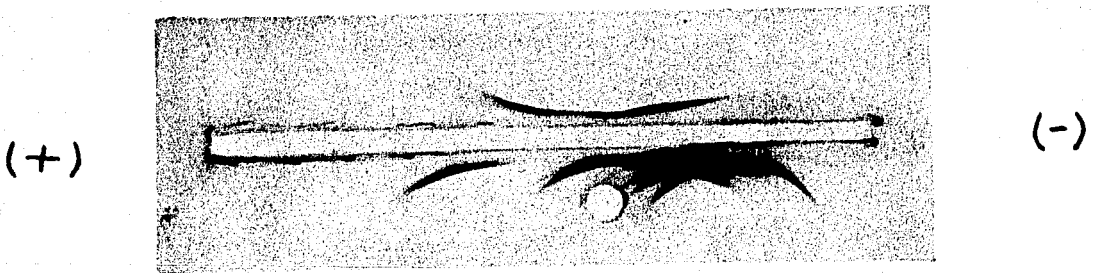


Fig 5. I.E.F. de los anticuerpos purificados (pozo superior), mediante el procedimiento descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. En el pozo inferior se colocó suero de borrego normal como control y en el pozo me dio suero de cerdo anti-suero de borrego como revelador.

lución compete con el DNP acoplado a la Sefarosa por los sitios activos de los Ac, eluyendo a los Ac de la columna formada por la Sefarosa-DNP-lisina.

Se concentraron las IgG por medio de ultrafiltración a presión (Amicon), hasta un volumen final de 36 ml y se pasaron por una columna (2 x 20 cm) de Dowex 1 (Pharmacia), una resina intercambiadora de aniones, en donde quedaron unidos los iones dinitrofenilato, permitiendo la recuperación de los Ac ya libres de DNP.

Posteriormente se determinó la densidad óptica de la solución de anticuerpo a 280 nm para determinar la concentración de proteína y a 363 nm para DNP. En la Figura 6 se observa la curva de elución del Ac de la columna de Dowex que muestra que el Ac no está contaminado con DNP.

Sin embargo, para asegurarse de que los Ac no tuvieron DNP, se hicieron diluciones de la fracción 17 que mostraba la mayor absorbencia a 363 nm y se comprobó que la relación de D.O. (densidad óptica), a 280 nm y 353 nm era igual a la de γ -globulinas sin DNP.

Se juntaron las fracciones 7-21 y en la mezcla se estimó una concentración de 12.6 mg/ml de proteína utilizando el método de Nessler (18).

Se verificó la actividad de los Ac por medio de D.I.D. con DNP₁₅-HSA, la cual resultó positiva.

Para asegurarse de que la especificidad de los Ac era en con-

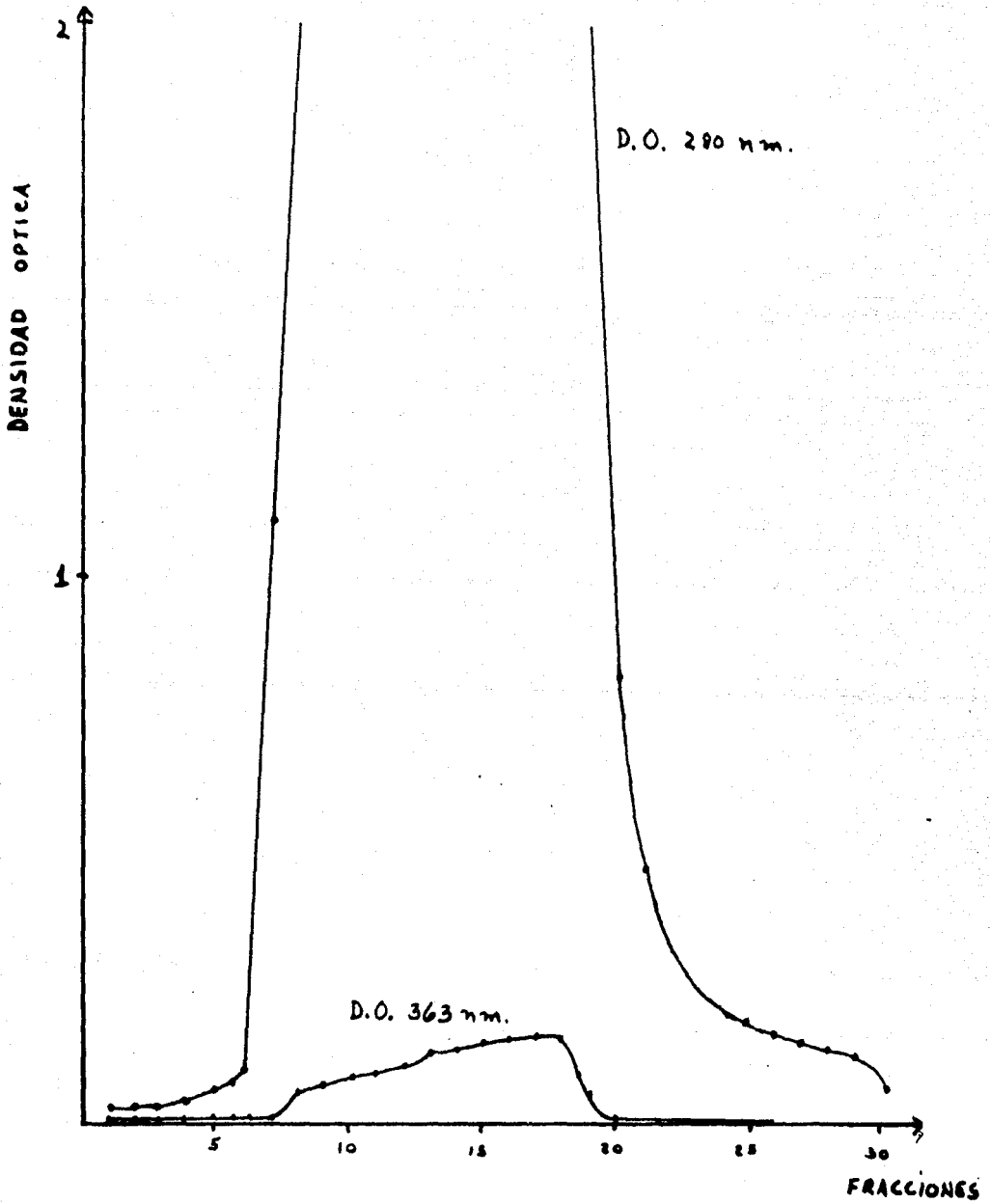


FIGURA 6 . Curva de elución de los Ac anti-DNP de la columna de Dowex.

tra del DNP y no contra la proteína acarreadora se hicieron D.I.D. de -- los Ac-anti-DNP puros contra las siguientes proteínas: γ -globulinas de -- borrego normal (resultado negativo); con DNP₁₄-HSA (resultado positivo); con HSA (resultado negativo); con DNP₇-BSA (resultado positivo); BSA (re-- sultado negativo); con ovoalbúmina OA (resultado negativo); DNP₁₀-OA (re-- sultado positivo) (Figura 7).

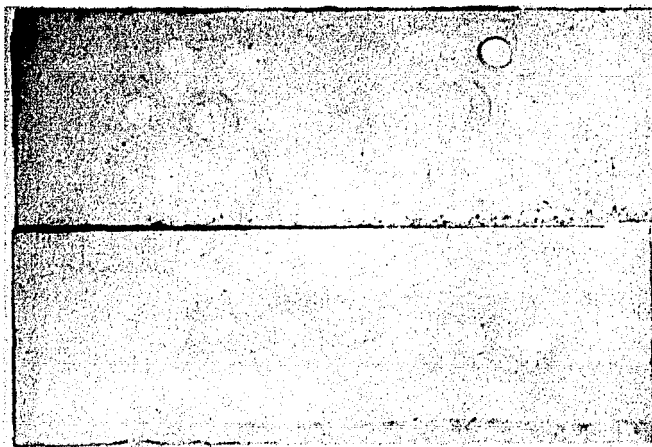
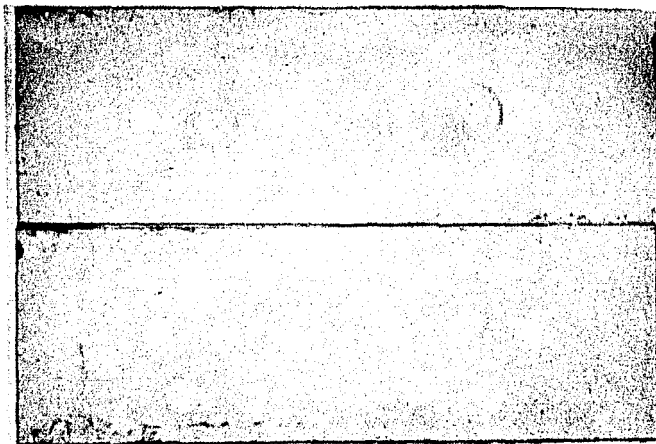
3. Preparación de soluciones amortiguadoras y geles

Se utilizaron 2 tipos de soluciones amortiguadoras; Sørensen y Barbitol.

a) Soluciones amortiguadoras de Sørensen

La solución amortiguadora de Sørensen consiste en una solu-- ción 0.14M de Na₂HPO₄ y de KH₂PO₄ (24). Su poder amortiguador va de pH 5- pH 8.5. Se modificó la manera de prepararlo poniendo además de los fosfa-- tos, NaCl y NaOH (1N) ó NCl (1N) hasta alcanzar el pH requerido. Para - preparar una solución madre se prepararon soluciones de Na₂HPO₄ 0.15M, -- (Baker) con NaCl 1.5M (Baker); y de KH₂PO₄ 0.15M (Baker) con NaCl 1.5M, y se mezclaron hasta obtener 100 ml de solución amortiguadora con un pH -- aproximado al requerido, medido en un potenciómetro (Beckman). Los pHs - empleados fueron: 3,4,5,7.4, 9,10 y 11.

Para obtener soluciones amortiguadoras de trabajo se tomó la solución amortiguadora madre como Sørensen concentrado, esta solución di-- luída 1:10 como Sørensen fisiológico (.15M), normal, y una dilución 1:10 de la solución madr como Sørensen diluido. La tabla indica las cantida-- des de HCl o NaOH necesarias para alcanzar el pH deseado.



2

Fig. 7. D.I.D. de los Ac purificados mediante el proceso descrito en el capítulo de Materiales y Métodos.
a) parte superior, pozos periféricos con DNP-HSA;
parte inferior, " " con HSA;
b) parte superior, " " con DNP-BSA;
parte inferior, " " con BSA.
En todos los casos se pusieron los Ac en los pozos centrales.

Sørensen $\mu = 0.021$ (diluido)			Sørensen $\mu = 0.21$ (fisiológico)		
pH	HCl NaOH	0.1N (* ml) 0.1N (Δ ml)	pH	HCl NaOH	1N (*ml) 1N (Δ ml)
3		* 1.20	3		* 1.40
4		* 0.70	4		* 1.00
5		* 0.30	5		* 0.90
7.4		0	7.4		0
9		Δ 0.20	9		Δ 0.30
10		Δ 0.45	10		Δ 0.40
11		Δ 1.20	11		Δ 0.60

Sørensen $\mu = 2.1$
(concentrado)

pH	HCl NaOH	1N (* ml) 1N (Δ ml)
3		* 11.50
4		* 10.30
5		* 9.30
7.4		0
9		Δ 0.90
10		Δ 2.20
11		Δ 7.80

b) Soluciones amortiguadoras de Barbital

La solución amortiguadora de Barbital consiste de una mezcla de barbital de Na 0.16M, acetato de Na 0.14M, con NaCl 1.46M y HCl 1N ó NaOH 1N para regular el pH. Su poder amortiguador abarca desde pH₃ hasta pH 11. (24).

Se prepararon las siguientes soluciones madre: Sol. A: barbital de Na 0.16M (Mallinckrodt), con acetato de Na 0.14M (Baker). Sol. B: HCl 1N ó NaOH 1N. Sol. C: NaCl 1.46M

Las soluciones amortiguadoras de trabajo se prepararon así: - 20 ml de la solución A más 8 ml de la solución C, se ajustó el pH con un potenciómetro, usando HCl 1N ó NaOH 1N (Ver Tabla X) y se aforó a 100 ml con H₂O destilada.

Con las soluciones A, B y C diluidas 1:10 se prepararon soluciones amortiguadoras a los mismos pHs.

No fué posible alcanzar la fuerza iónica de 2.1 en este -- buffer debido a la poca solubilidad del Barbital.

En los dos tipos de soluciones amortiguadoras la f.i. se calculó con la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum mZ^2$$

donde μ = fuerza iónica

\sum = suma de todos los términos siguientes

m = molalidad (mol del ion/1000 g solvente)

Z = valencia (35)

Tabla X. Soluciones amortiguadoras de Barbital

Barbital $\mu = 0.021$			Barbital $\mu = 0.21$		
pH	HCl 0.1N (* ml) NaOH 0.1N (Δ ml)		pH	HCl 1N (* ml) NaOH 1N (Δ ml)	
3	* 6.30		3	* 6.20	
4	* 5.70		4	* 5.60	
5	* 4.30		5	* 4.20	
7.4	* 2.70		7.4	* 2.50	
9	* 0.35		9	* 0.30	
10	Δ 0.10		10	0	
11	Δ 0.35		11	Δ 0.10	

c) Preparación de geles

Los geles se prepararon poniendo 0.85 g de agarosa Sigma tipo II en 100 ml de c/u de las soluciones amortiguadoras, se disolvieron en el horno y se vertieron en tubos en fracciones de 12 ml. Se midió el pH de los geles aún líquidos con papel indicador Merck (pH 0 - pH 14) (Ver - Tabla Y).

Tabla y. pH de los geles después de disolver.

Sørensen diluido $\mu = 0.021$

Sørensen fisiológico $\mu = 0.21$

pH		pH	
antes	después	antes	después
3	4	3	5
4	5.5	4	5
5	6	5	6
7.4	7.4	7.4	7.4
9	8	9	8
10	8	10	7
11	9	11	9

Sørensen concentrado $\mu = 2.1$

pH	
antes	después
3	3
4	4
5	5
7.4	7.4
9	9
10	11
11	12

Barbital $\mu = 0.021$

pH	
antes	después
3	4
4	4
5	5
7.4	7.4
9	8.5
10	8.5
11	9

Barbital $\mu = 0.21$

pH	
antes	después
3	4
4	4
5	5
7.4	7.4
9	9
10	10
11	10.5

4. Ensayos de doble inmuno difusión

Se calentaron en baño maría tubos conteniendo geles al 0.85% con PBS y 11 ml del gel líquido se colocaron sobre laminillas dispuestas en soportes previamente nivelados (Fig. 8). Se dejaron gelificar y se colocaron en cámara húmeda a 4°C por 24 horas. Después se perforaron los pozos en la agarosa, poniendo en los pozos periféricos diluciones progresivas de Ac, y en el pozo central el Ag.

En primera instancia se hicieron D.I.D. preliminares para determinar las concentraciones óptimas de Ac y de Ag para precipitar. Las concentraciones de Ac utilizadas fueron 12.6, 6.3, 3.15, 1.57, 0.78 y 0.39 mg/ml, y las de Ag 2,1,0.5,0.25,0.12 y 0.06 mg/ml.

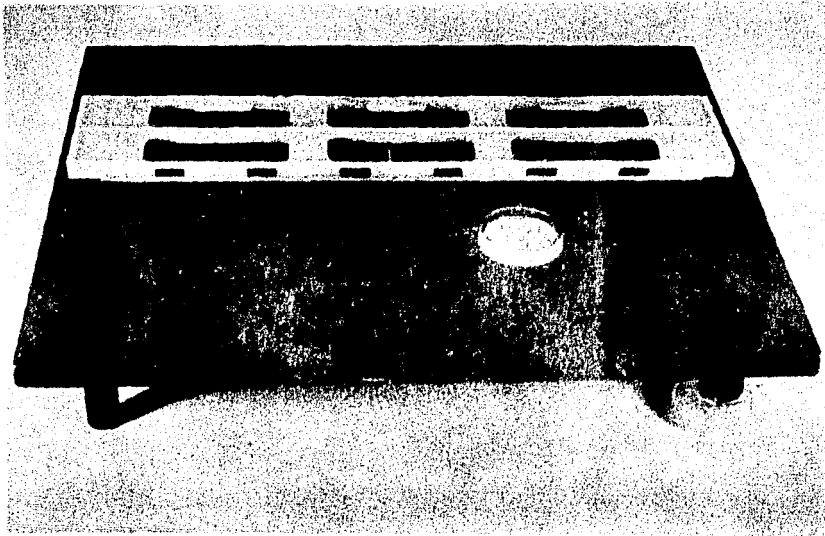


Fig. 8. Manera usual de colocar las laminillas en soportes de plástico sobre una mesa nivelable para hacer D.I.D.

Las laminillas se colocaron en cámara húmeda a temperatura ambiente por 24 horas, y después se observaron con una lámpara de luz blanca para contar las bandas de precipitación.

Después se lavaron las placas con 2 cambios de solución salina 0.15M a 4°C (1 litro cada vez), y con 1 l de agua destilada, se cubrieron con papel filtro y se secaron al aire. Se tiñeron con amido negro al 0.1% (Sigma) en ácido acético al 10% por 10 min, y se aclararon con una solución de ácido acético al 10% y glicerol al 1%.

Se obtuvieron bandas de precipitación con 0.5, 0.25 y 0.12 mg/ml de antígeno y con 12.6, 6.3, 3.15 y 1.57 mg/ml de Ac, por lo cual se decidió explorar concentraciones de Ac entre 3.15 y 1 mg/ml, que fueron 3.1, 2.7, 2.3, 1.9, 1.5 y 1.1 mg/ml.

Se hicieron D.I.D. en todas las condiciones señaladas en el capítulo de Diseño experimental, excepto a pH 3 en las dos soluciones amortiguadoras, porque no gelificó la agarosa, con 10 replicas, dando un total de 5400 experimentos.

RESULTADOS

a) Efecto del pH sobre la precipitación en D.I.D.

pHs ácidos favorecen la aparición de bandas de precipitación, como se observa a pH 4 en Barbital $\mu = 0.021$, a pH 5 en Barbital $\mu = 0.21$, a pH 6 en Sørensen $\mu = 0.021$ y a pH 5 en Sørensen $\mu = 0.21$ (Tabla I y II, figuras 9 y 10).

b) Efecto de la fuerza iónica sobre la precipitación en D.I.D.

Una elevación de 10 veces la f.i. provoca una tendencia a aumentar el número de bandas en la solución amortiguadora de Barbital (excepto en el caso del pH 4 en que ocurre lo contrario).

La fuerza iónica produce efectos dependiendo del pH en la solución amortiguadora de Sørensen. Así, vemos que el pH 6 en $\mu = 0.021$ y $\mu = 0.21$, (pH 5 en $\mu = 2.1$), induce una disminución en el número de bandas; a pHs básicos (pH 8.5 a $\mu = 0.021$, pH 9 a $\mu = 0.21$ y pH 12 a $\mu = 2.1$) se observa un aumento en el número de bandas; mientras que a pH 7.4 y pH 9 en $\mu = 2.1$ se localizan el mayor número de bandas. (Tabla I y II, Figuras 9 y 10).

c) Efecto de la composición iónica sobre la precipitación en D.I.D

Se observa mayor proporción de reacciones positivas en la solución amortiguadora de Sørensen en $\mu = 0.021$, comparando con la misma f.i. de la solución amortiguadora de Barbital.

En la solución amortiguadora de Barbitol a $\mu = 0.21$ se registran el mayor número de reacciones positivas en los pHs ácidos, (a excepción del pH 4), y a pH 7.4; mientras que con la solución amortiguadora de Sørensen a pHs básicos se observaron menos reacciones positivas. (Tablas I y II, Fig. 9, 10 y 11).

d) Análisis estadístico

Como se mencionó anteriormente en el capítulo de Diseño experimental, los resultados se analizaron por un ANOVA (análisis de varianza), de 3 vías, modificado por el hecho de ser un diseño experimental anidado. En este análisis global se excluyó la fuerza iónica de 2.1 de la solución amortiguadora de Sørensen, para hacer simétrico el diseño y facilitar su análisis (Tabla III y Tabla IV).

En la Tabla 4 vemos que todas las variables examinadas son significativas ($P < 0.001$) en la producción de bandas de precipitación, así como también las combinatorias de 2 y de 3 variables, siendo el cociente de varianzas, es decir, la importancia relativa de los efectos de las variables sobre la precipitación en D.I.D., para efectos de 1 variable: pH > composición iónica > fuerza iónica; para efectos de 2 variables: -- pH - f.i. > pH- composición iónica > f.i.- composición iónica.

Se hicieron ANOVAS de 2 vías para ver separados los dos sistemas de soluciones amortiguadoras y considerar la $\mu = 2.1$ en la solución amortiguadora de Sørensen (Tabla V). En el análisis se verificó que las variables investigadas del medio ambiente fisicoquímico son determinantes en la precipitación del complejo Ag-Ac en doble inmuno difusión (Tablas IV y V).

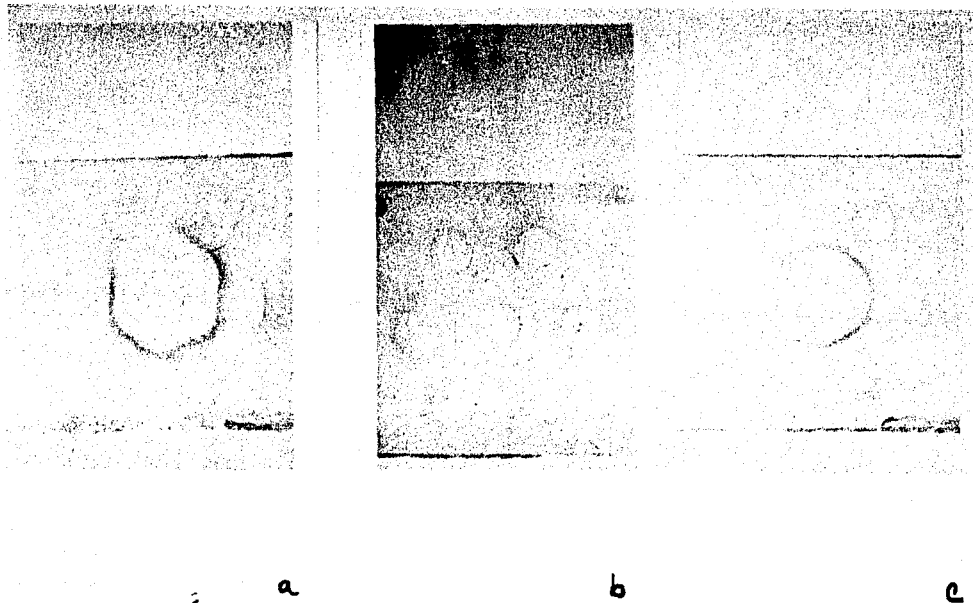


Fig. 11. D.I.D. donde se observan: a) bandas de precipitación claras (Sørensen $\mu=0.021$ pH8);
b) bandas de precipitación poco definidas (Barbital $\mu=0.21$, pH4);
c) bandas de precipitación bien definidas (Barbital $\mu=0.21$, pH5).

TABLA I. % DE REACCIONES POSITIVAS EN LA SOLUCION AMORTIGUADORA DE SØRENSEN

		5.5				6				7			7.4			
		Ag 0.12 .25 .50				Ag 0.12 .25 .50										
		Ac				Ac										
0.021		1.1	.2	.1	0	1.1	.3	.1	.1	0	0	0	.3	.2	.3	0
		1.5	.8	.6	.2	1.5	1	.9	.1	.4	0	0	.7	.4	.3	.7
		1.9	.9	.6	.4	1.9	1	.9	.7	.7	.4	0	1	1	.4	.5
		2.4	.9	1	.8	2.4	1	1	.9	.8	.7	.3	.9	1	.9	.9
		2.7	1	.9	1	2.7	1	1	1	.9	.8	1	1	1	.9	1
		3.1	1	.9	.7	3.1	1	1	1	1	1	.9	1	1	.5	1
		$\bar{x} = 0.66$					$\bar{x} = 0.77$					$\bar{x} = 0.48$				$\bar{x} = 0.71$
Fuerza iónica 0.21		5				6				7.4						
		Ag 0.12 .25 .50														
		1.1	.6	0	0	.2	.1	0	0 0 0 0							
		1.5	1	.8	0	1	.6	0	.3 .2 0 .3							
		1.9	1	.6	.5	1	.7	.5	.9 .7 0 .4							
		2.4	1	.9	.8	1	.8	.7	1 .8 .6 .7							
		2.7	1	1	.9	1	1	1	1 1 1 .9							
	3.1	1	1	.7	1	1	.8	1 1 .9 1								
	$\bar{x} = 0.71$					$\bar{x} = 0.68$					$\bar{x} = 0.57$					
2.1		4			5			7.4								
		.4	.4	0	.3	.4	0	1 1 .8								
		.4	.4	0	.5	.5	0	.9 1 .8								
		.4	.4	.1	.5	.4	.4	1 1 .8								
		.4	.4	.3	.7	.7	.4	1 1 1								
		.4	.4	.4	1	1	.7	1 1 1								
		.4	.4	.4	1	1	.7	1 1 1								
	$\bar{x} = 0.33$				$\bar{x} = 0.56$				$\bar{x} = 0.96$							
	\bar{x} columna:															
	.71	.60	.50	.80	.72	.50	.83 .79 .62									

2N

7	7.4	8	8.5	\bar{x} renglón:
0 0 0	.3 .2 .3	0 0 0	0 0 0	.08
.4 0 0	.7 .4 .3	.7 .5 .3	.4 0 0	.40
.7 .4 0	1 1 .4	.5 .4 .5	.4 0 0	.54
.8 .7 .3	.9 1 .9	.9 .7 .5	.4 .2 .1	.72
.9 .8 1	1 1 .9	1 1 .9	.7 .8 .5	.91
1 1 .9	1 1 .5	1 1 .7	.8 .6 .4	.86
$\bar{x} = 0.48$	$\bar{x} = 0.71$	$\bar{x} = 0.58$		

7.4	8	9	
0 0 0	0 0 0	0 0 0	.05
.3 .2 0	.3 0 0	.4 0 .1	.29
.9 .7 0	.4 .1 .3	.7 0 .2	.51
1 .8 .6	.7 .7 .5	.8 .5 .4	.77
1 1 1	.9 1 .9	.9 .9 .8	.95
1 1 .9	1 1 .8	.9 1 1	.94
$\bar{x} = 0.57$	$\bar{x} = 0.48$	$\bar{x} = 0.47$	

7.4	9	12	
1 1 .8	1 1 .5	.2 0 0	.42
.9 1 .8	1 1 .7	.7 .2 .2	.52
1 1 .8	1 1 1	.9 .5 .6	.66
1 1 1	1 1 1	.9 1 .8	.72
1 1 1	1 1 1	1 .9 .7	.78
1 1 1	1 1 1	.8 .6 .7	.76
$\bar{x} = 0.96$	$\bar{x} = 0.95$	$\bar{x} = 0.59$	

.83 .79 .62

.80 .74 .59 .60 .40 .36

TABLA II. % DE REACCIONES POSITIVAS EN LA SOLUCION AMORTIGUADORA DE BARBITAL

		4			5			7.4			8.5			
		Ag	0.12	.25	.50									
		Ac												
0.021		1.1	.3	.2	.1	.4	0	0	0	0	0	0	0	0
		1.5	.9	.8	.7	1	.7	.4	8	.1	0	.4	.2	0
		1.9	1	1	.8	1	1	.4	1	.5	.4	.9	.3	.1
		2.4	1	1	.9	.9	.9	.6	1	.8	.6	1	.4	.3
		2.7	1	1	1	0	.9	1	1	1	1	1	.7	.5
		3.1	1	1	1	0	1	1	1	7	1	.8	.6	.3
		$\bar{x} = 0.81$				$\bar{x} = 0.62$				$\bar{x} = 0.60$				$\bar{x} = 0.41$
0.21		0	0	0	.3	.4	.1	.2	.1	0				
		0	0	.2	.9	.8	.6	.7	.6	0				
		.2	0	.3	1	1	9	.9	.6	.5				
		.1	0	.3	1	1	1	1	.9	.8				
		.2	.2	.3	1	1	1	1	1	1				
		0	.1	0	1	1	1	1	1	1				
		$\bar{x} = 0.10$				$\bar{x} = 0.83$				$\bar{x} = 0.68$				
		\bar{x} columna:												
		.47	.44	.46	.70	.80	.66	.80	.60	.52				

AMORTIGUADORA DE BARBITAL

7.4					8.5			9			10			10.5			\bar{x} renglón:
0	0	0	0	0	.3	0	0	0	0	0	0	0	0	.08			
.1	0	.4	.2	0	.3	0	0	.3	.1	0	.4	.2	0	.37			
.5	.4	.9	.3	.1	.3	.2	0	.5	.3	.1	.7	.4	0	.52			
.8	.6	1	.4	.3	.3	.3	.1	.7	.8	.3	.8	.5	.4	.61			
1	1	1	.7	.5	.7	.8	.3	.9	.8	.8	.8	.8	.1	.80			
7	1	.8	.6	.3	1	.7	.6	1	.9	.6	.6	.6	.2	.80			
= 0.60					$\bar{x} = 0.41$			$\bar{x} = 0.32$			$\bar{x} = 0.41$						
7.4					9			10			10.5						
2	.1	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	.06			
7	.6	0			.3	0	0	.4	.1	0	.4	.2	0	.28			
9	.6	.5			.5	.3	.1	.3	.3	.2	.7	.4	0	.45			
	.9	.8			.7	.8	.4	.4	.4	.3	.8	.5	.4	.60			
	1	1			.9	.8	.8	.8	.9	.5	.8	.8	.1	.72			
	1	1			1	.6	.4	1	.9	.6	.6	.6	.2	.66			
= 0.68					$\bar{x} = 0.42$			$\bar{x} = 0.39$			$\bar{x} = 0.41$						
30	.60	.52			.55	.42	.20	.58	.40	.23	.51	.37	.14				

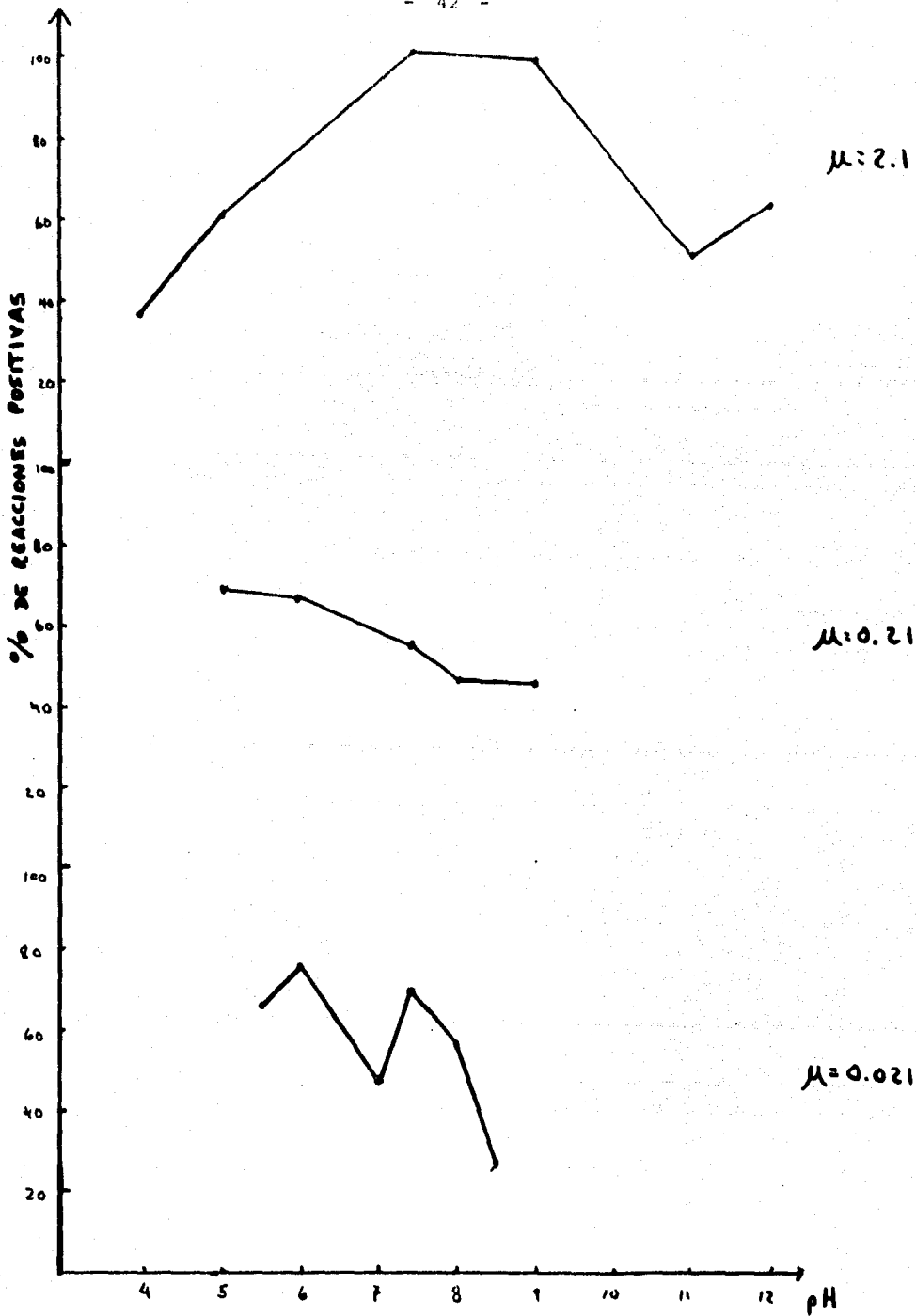


FIGURA 9. BUFFER DE SØRENSEN. Variación del % de reacciones positivas con relación al pH y μ .

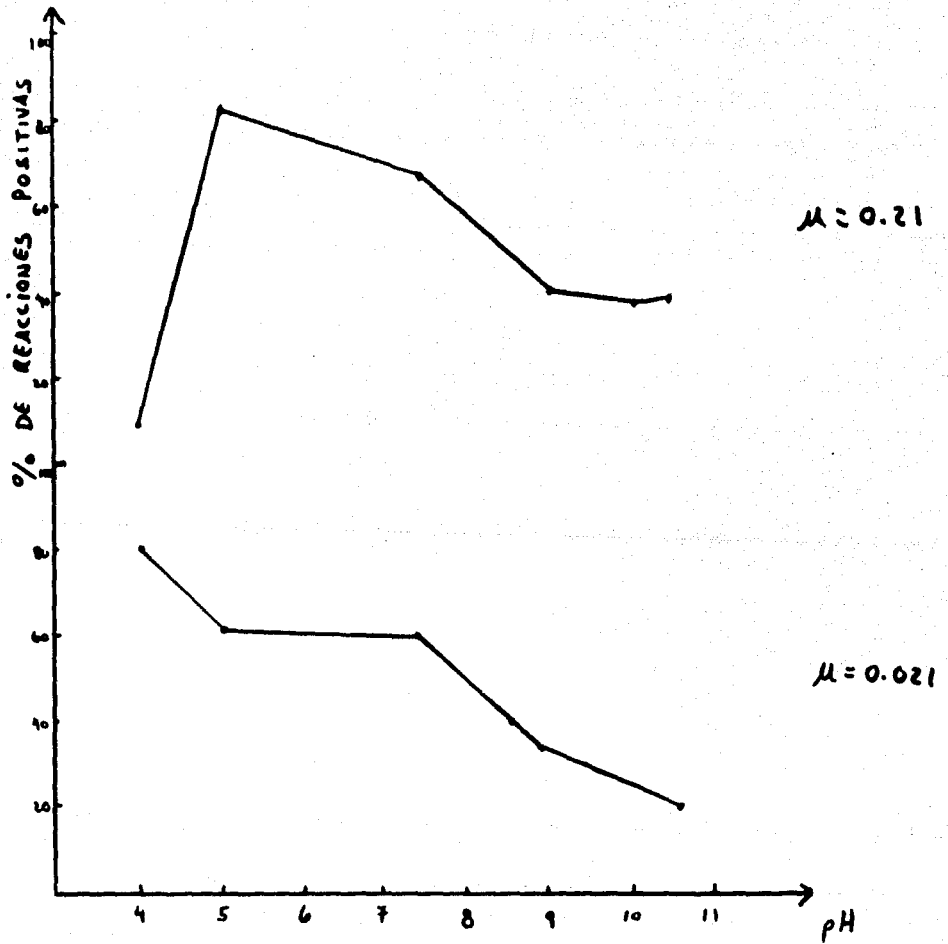


FIGURA 10 . BUFFER DE BARBITAL. Variación del % de reacciones positivas con relación al pH y μ .

Tabla III. ANOVA total computarizado, excluyendo a Sørensen $\mu=2.1$.

ONE VARIABLE FACTORIAL ANALYSIS OF VARIANCE					
INDIV GROUP =	1				
SAMPLE SIZE =	172				
RESPONSE VARIABLE =	Y ₁				
DESIGN VARIABLES ARE:					
A	7				
B	3				
C	3				
ANALYSIS OF VARIANCE TABLE					
SOURCE OF VARIATION	DEGREES OF FREEDOM	SUM OF SQUARES	MEAN SQUARE	F RATIO	F _{0.05} CRIT
MEAN	1	107.9297	107.9297	3870.1011	1.000
A	6	6.8533	1.1422	38.0000	1.000
B	2	2.8541	1.4270	46.7600	1.000
C	2	2.3316	1.1658	37.3000	1.000
AB	12	1.1734	0.0978	3.0600	1.000
AC	6	0.7654	0.1276	4.0000	1.000
BC	2	0.6650	0.3325	10.4000	1.000
ABC	12	0.1167	0.0097	0.3000	1.000
AB ²	4	0.4011	0.1003	3.2000	0.100
AC ²	2	0.3717	0.1859	5.8000	0.050
BC ²	1	0.7151	0.7151	22.4000	1.000
ABC ²	2	0.1106	0.0553	1.7000	1.000
ARCD	6	3.1537	0.5256	16.5000	1.000
ARD	1	2.4034	2.4034	76.0000	0.001
ARD ²	1	1.2722	1.2722	39.6000	1.000
ACD	1	1.4228	1.4228	44.1000	1.000
ACD ²	1	1.2715	1.2715	39.3000	1.000
BCD	1	0.4333	0.4333	13.4000	0.006
BCD ²	1	0.1867	0.1867	5.8000	0.050
BCD ³	1	0.1107	0.1107	3.4000	0.030
BCD ⁴	1	0.1476	0.1476	4.5000	0.060
ARCD ²	1	0.2667	0.2667	8.2000	0.061
ARCD ³	1	0.2448	0.2448	7.5000	0.064
ARD ²	1	1.0722	1.0722	32.9000	0.010
ARD ³	1	1.2706	1.2706	38.8000	0.017
ARD ⁴	1	0.2437	0.2437	7.5000	0.010
POOLED ERROR	79	0.7200	0.0091		
TOTAL	172	107.9500			

Tabla IV. ANOVA total modificado, con las variables Ag y Ac anidadas.

Fuente de Variación	grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	
EFFECTOS PRINCIPALES					
pH	5	6.4093	1.2818	46.039	* *
ci	1	0.8445	0.8445	30.3308	* *
fi	1	0.1234	0.1234	4.432	*
INTERACCIONES DE PRIMER ORDEN					
pH-fi	5	2.1771	0.4354	15.638	* *
pH-ci	5	0.7893	0.1578	5.669	* *
fi-ci	1	0.1167	0.1167	4.193	*
INTERACCIONES DE SEGUNDO ORDEN					
pH-ci-fi	5	3.1593	0.6318	22.693	* *
VARIABLES ANIDADAS					
Ag en pHcifi	48	6.1244	0.1275	4.582	* *
Ac en pHcifi	120	39.0594	0.3254	11.690	* *
ERROR					
(Ag-Ac en pH-ci-fi)	240	6.6823	0.0278		
TOTAL	431	65.59			

* es significativa ($P < 0.05$); * * es muy significativa ($P < 0.001$).

Tabla V. ANOVA de SØRENSEN.

Fuente de Variación	grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F		
EFECTOS PRINCIPALES						
pH	5	4.1173	0.8234	39.143	*	*
fi	2	0.2564	0.1284	6.1058	*	*
INTERACCIONES DE PRIMER ORDEN						
pH-fi	5	4.7822	0.9564	45.464	*	*
VARIABLES ANIDADAS						
ci en pH-fi	42	6.4510	0.1535	7.301	*	*
Ag en Ph-fi	90	25.9517	0.2883	13.706	*	*
ERROR	180	3.7867	0.0210			

ANOVA de BARBITAL

Fuente de Variación	grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F		
EFECTOS PRINCIPALES						
pH	5	4.1156	0.8231	28.158	*	*
ri	1	0.2400	0.2400	8.210	*	*
INTERACCIONES DE PRIMER ORDEN						
pH-fi	5	4.7822	0.9564	32.719	*	*
VARIABLES ANIDADAS						
ci en pH-fi	24	3.1056	0.1294	4.426	*	*
Ag en pH-fi	60	16.4288	0.2738	9.367	*	*
ERROR	120	3.5078	0.0292			

* es significativa ($P < 0.05$); * * es muy significativa ($P < 0.001$)

DISCUSION

Los resultados presentados en este trabajo corresponden a los efectos del pH, fuerza iónica y composición iónica sobre la precipitación cualitativa de complejos Ag-Ac, evaluada con D.I.D.

Un hecho notable fué el observar que los anticuerpos conservan sus propiedades de reconocimiento en condiciones externas de pH y de alta concentración de sales.

El análisis estadístico de los Resultados (Tablas IV y V), muestra que los efectos del pH, f.i. y composición iónica son significativos: $P < 0.001$, $P < 0.05$ y $P < 0.001$ respectivamente.

Es interesante observar que la magnitud de F, el cociente de varianzas, es diferente para cada una de las variables investigadas, de tal manera que F del pH es mayor que F de la composición iónica, que a su vez es mayor que la F de la fuerza iónica. Así, podemos decir que en estos experimentos de precipitación en D.I.D. el orden de importancia relativa de cada una de las variables es en primer lugar del pH, en segundo la composición iónica y finalmente de la f.i.

De igual manera podemos clasificar la importancia de los efectos producidos por la combinación de 2 variables, en primer lugar pH -f.i., en segundo pH- composición iónica, y finalmente f.i.- composición iónica.

Los efectos de la combinación de las 3 variables también son estadísticamente significativos ($P < 0.001$) (Tabla IV).

Asimismo las dosis de Ag (Ag en pH-Fi-ci) y de Ac (A en pH-Fi-cl) son significativas ($P < 0.001$ para ambas) (Tabla IV).

Analizando estadísticamente los dos sistemas de soluciones -- amortiguadoras por separado (Tabla V), vemos que los efectos del pH son -- más importantes en la precipitación en D.I.D., que los efectos de la f.i.; resultado similar al que se encontró en el análisis global.

A continuación se exponen algunos argumentos de carácter especulativo a nivel atómico acerca de los efectos de las variables principales.

Cuando mencionamos el término "anticuerpo", está implícito el hecho de que nos referimos a una población de anticuerpos que es hetero--génea con respecto a su afinidad por el antígeno determinado. Es muy probable que esta población de anticuerpos sea también heterogénea en un sentido funcional, de tal manera que esté integrada por subpoblaciones y que sea una de estas subpoblaciones la que reaccione o reconozca al antígeno a medida que las condiciones del medio ambiente fisicoquímico se alejen -- de las condiciones fisiológicas "normales" (pH 7.4, $\mu = 0.21$, fosfatos).

A pHs ácidos los anticuerpos sufren cambios conformacionales que aumentan la probabilidad de su precipitación y que resultan en su desdoblamiento parcial, provocado por fuerzas electrostáticas repulsivas, --

que son generadas por la abundancia de protones en el medio, y que neutralizan otro tipo de fuerzas estabilizadoras de la molécula, como pueden -- ser uniones hidrófobas y puentes de hidrógeno (12).

Mediante espectros de dicroísmo circular se ha visto que la - disminución en el coeficiente de sedimentación y el aumento de la viscosi- dad de IgG en solución ácida indican desdoblamiento parcial de la proteí- na (12). Los resultados obtenidos por nosotros están de acuerdo con es-- tas observaciones, aunque tendríamos que verificarlos midiendo el coefi-- ciente de sedimentación y la viscosidad de los Ac.

Por otra parte la viscosidad de las γ -globulinas aumenta a - pHs ácidos cuando se disminuye la f.i. del medio, y este hecho refleja -- cambios estructurales pues aumenta la asimetría de la mole-- cula, que es acompañada por una disminución de su volumen. Estos cambios son proporcionales a la acidez del medio.

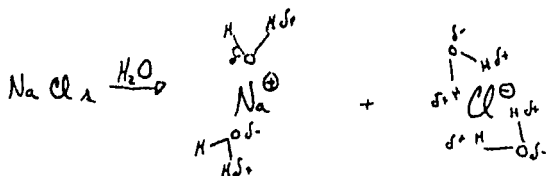
Estos razonamientos pueden explicar la elevada frecuencia de precipitación a pHs ácidos.

Se observa que las proporciones de precipitación en la solu-- ción amortiguadora de Barbital, $\mu = 0.21$, que son de 0.10 a pH 4 y de -- 0.83 a pH 5. γ Por otra parte se sabe que la molécula de DNP (dinitrofenol) es hidrófoba por presentar uniones C-H, y si el ligando DNP-lisina es hidró- fobo, entonces el sitio activo de su anticuerpo debe también ser de natu- raleza hidrófoba y por ende estar situado a una cierta profundidad de la molécula, y no en contacto con el solvente (33). Se puede especular y --

decir que a pH 4 en Bsrbital había una subpoblación funcional de anticuerpos muy pequeña y la porción más abundante, supuestamente activa a otros pHs, no precipitó en el medio ácido porque tal vez el Ac había sufrido - desdoblamientos o cambios en su conformación que le impidieron reconocer al antígeno. A pH 5 en Barbital se debería presentar una situación como la descrita anteriormente para pHs ácidos (Ver pág. 49).

El hecho de que haya menos reacciones de precipitación a pHs básicos en los dos sistemas de soluciones amortiguadoras (Tablas 1 y 2), tal vez pueda deberse al enmascaramiento con cargas (-) de los sitios activos de algunas moléculas de Ac, pues el DNP se comporta como anión a - pHs básicos.

La elevada proporción de reacciones positivas a pH 7.4 y pH 9 en la solución amortiguadora de Sørensen $\mu = 2.1$ puede deberse a la agregación de las proteínas (11). Cuando se disuelve el cloruro de sodio se ioniza, y los iones $\text{Na}^{(+)}$ y $\text{Cl}^{(-)}$ se rodean de una película de agua (agua de hidratación), unida por diferencias en las cargas parciales (Ver ilustración). Las sales neutras, $\text{Na Cl}_{(s)} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \text{Na}^{(+)}$



ejercen efectos marcados en la solubilidad de las proteínas globulares. A

bajas concentraciones aumenta la solubilidad de algunas proteínas (solubilidad por salado o salting-in). Este efecto está en función de la concen

tración de la sal y de la valencia de los iones. Los efectos de la solu bilización por salado resultan de cambios en la tendencia a ionizarse de los grupos disociables de la proteína.

Cuando la concentración de sales aumenta mucho, la solubili- dad de las proteínas disminuye, y a concentraciones muy elevadas la pro- teína puede precipitar (precipitación por salado o salting-out. La base fisicoquímica de este efecto no está completamente clara (25).

Pudiera ser que al aumentar la salinidad del medio, se re--- quieran mayor número de moléculas de agua para la hidratación de los -- iones respectivos, de manera que disminuya la cantidad de agua disponible en el medio en que se encuentran el anticuerpo y el antígeno. Así, se -- pueden producir repulsiones de tipo iónico entre moléculas de Ac debido - al contacto más inmediato que presentan entre sí, por la disminución del agua accesible del medio. Un efecto visible de tales interacciones en me dio salino puede ser la precipitación masiva de los complejos Ag-Ac.

A pesar de haber utilizado una estrategia basada en experi-- mentos cualitativos, como lo es la D.I.D., es evidente que factores fisi- coquímicos del medio ambiente como el pH, composición iónica y fuerza -- iónica, pueden provocar cambios en los Ac anti-DNP y en el Ag DNP₁₅-HSA - que se reflejan en modificaciones de su precipitación.

La relación que puede existir entre estos experimentos y la hipótesis de multiespecificidad de los Ac es indirecta, y radica en que -

si se considera que existen en un organismo diversos microambientes, con características fisicoquímicas particulares, más bien diferentes de las características fisiológicas "normales" (suero pH 7.4, Cl = 103 meq/l, -- Na = 140 meq/l), como por ejemplo el fluido cerebrospinal (pH 7.35 - 7.70, Cl = 440 mg/100 ml, Na = 525 mg/100 ml), los fluidos digestivos (como - el jugo gástrico, pH 1.49 - 8.38, Cl = 120 mg/100 ml, Na = 49 mg/100 ml) (34), entonces podemos pensar que si ocurre un encuentro entre un Ac y un Ag en un microambiente determinado, este podrá modificar la reactividad - del Ac, y posiblemente pueda modificar su especificidad, haciendo al Ac - multiespecífico, es decir, hacerlo que reconozca a más de un determinante antigénico.

Esta serie de experimentos tuvo la interacción de exploración preliminar. Se pretende en el futuro seguir por esta línea de investiga-- ción, con experimentos de diálisis en equilibrio para encontrar el valor - de la constante de asociación entre los Ac anti-DNP y el hapteno DNP-lisi-- na. En este caso la variable respuesta (la constante de asociación) es de tipo continuo, es decir que puede adoptar un rango muy amplio de valores. Estos experimentos se harán en combinatorias particularmente interesantes de condiciones del medio ambiente fisicoquímico que nos permitan hacer una correlación entre el fenómeno de precipitación y la afinidad, con el propó-- sito de predecir si el encuentro de Acs anti-DNP con una proteína dinitro-- fenilada, tendrán como resultado la precipitación de complejos en las con-- diciones examinadas.

A largo plazo se tratará de contestar la pregunta ¿de qué ma-- nera y en qué grado influye el reconocimiento, de la estructura de las --

moléculas, en las reacciones Ag-Ac?. Parece probable que factores conformacionales y del medio ambiente afectan la reactividad de los aminoácidos en las proteínas.

BIBLIOGRAFIA.

1. Eisen, H.N. (1974). Immunology. Harper y Row. Maryland 624 p.p.
1a. Ed.
2. Steward, M.W. (1977). Affinity of the antibody-antigen reaction and
its biological significance. En: Immunochemistry: on
advanced textbook. (Glynn, L.E. y Steward, M.W. eds.).
Benjamin, New York: 233-262.
3. Turner, (1977). Structure and function of immunoglobulins. *ibid.*
1:1-57.
4. Hood, L. y Talmage, D. (1970). Science N. Y. 168, 325.
5. Jerne, N. K. (1971). Eur. J. Immunol. 1, 1.
6. Gally, J.A. y Edelman, G.M. (1970). Nature (London) 227, 341.
- 6' Cohn, M., et al (1974). In the Immune System: genes, receptors,
Signals. (Sercarz, E., Williamson, A. y Fox C. eds.)
Acad. Press. New York p. 89.
7. Rosenstein, R.W., Musion, R.A. Armstrong, M.Y., Koniysberg, W.H., y
Richards, F.F. (1972). Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 69:
877-881.
8. Underdosen, B.J. y Eisen, H.N. (1971). J. Immunol. 106, 1431-1440.
9. Riesen, W. y Morell, A. (1972). Immunochem. 9: 979-985.
10. ~~Im~~man, J.K. (1977). The antibody combining region: speculations
on the hypothesis of general multispecificity. En: Theore-
tical Immunology (Bell, G.I., Perelson, A.S. Peinbley G.
H., eds.). Marcel Dekker Inc. 243-278.

11. Phelps, R.A. y Cann, J.R. (1957). Biochimica et Biophysica Acta. 23: 149-154.
12. Doi, E. y Jirgensons, B. (1970). Biochemistry 9 (5): 1066-1073.
13. Minta, J.O. y Vetvutonapibul, W. (1978). Immunochemistry 15: 93-96.
14. Paulssen, M. Schuurman, H.J., Dekker, B.J. y De Ligny, O.L. (1978). Immunochemistry 15: 275-278.
15. Knight, C.J., y Green, N. M. (1979) Biochem. J. 1977: 225-236.
16. Eisen, H.N. y Sichird, J.W. (1964). Biochemistry 3: 996.
17. Eisen, H.N. (1964). Meth. Med. Res. 10: 115.
18. Koch, F.C., McMeekin, T. (1924). J. Am. Chem. Soc. 46: 2066.
19. Eisen, H.N. (1964). Meth. Med. Res. 10: 94.
20. Ouchterlony, O. (1948). Acta Pathol. Microbiol. Scand. 25: 186.
21. Campbell, D.H., Garvey, Z.S. Cremer, N.E. y Sussdorf, D.H. (1970). Methods in Immunology. W.A. Benjamin, N.Y.
22. Grabar, P. y Williams, C.A. (1953). B. B. Acta 10: 193.
23. Marck, S.C., Parikh, I. y Cuatrecasas, P. (1974). Analytical Biochemistry 60: 149-152.
24. Williams, C.A. y Chase, M.W. (1968). Methods in Immunology and Immunochemistry. Academic Press, New York. Appendix II, pp 365-408.
25. Lehninger, A.L. (1972). Bioquímica Omega. Barcelona: 144. 1a. ed.
26. Landsteiner, K. (1945). The specificity of serological reactions. Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass.

27. Glasser, D.L., Silvers, W.K. (1974). Adv. Immunol. 18: 1.
28. Hermans, J.F. (1959). Clin. Chim. Acta 4: 639.
29. Porter, R.R. (1959). Biochem. J. 73: 119.
30. Porter, R.R. (1962). Symposium on Basic Problems in Neoplastic Disease. (Gelhorn, A. y Hirschbery, E. eds). Col. Univ. Press. pp. 177.
31. Hicks, C.R. (1973). Fundamental Concepts in the Design of Experiments. Holt, Rinehart and Winsten. New York 2a. Ed.
32. C. P. del M. en C. Guillermo Baz del I.I.M.A.S.
33. Winkelhake, J.L. y Voss, E.W. (1970). Biochemistry 9 (8): 1845.
34. Handbook of Biological Data (1956). Williams S. Spector, ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia: 4, 57, 61.
35. Morris, J.G. (1974). A biologist's physical Chemistry. Addison - Wesley, London. p. 83. 2a. Ed.